

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭55—37944

⑤ Int. Cl.³
G 01 N 33/50

識別記号

庁内整理番号
6656—2G

⑬ 公開 昭和55年(1980)3月17日

発明の数 2
審査請求 未請求

(全 5 頁)

⑭ 腎疾患の診断薬及び診断方法

① 特 願 昭53—111020
② 出 願 昭53(1978)9月9日
⑦ 発 明 者 柴田整一
東京都新宿区高田馬場四丁目40

番11号
⑧ 出 願 人 柴田整一
東京都新宿区高田馬場四丁目40
番11号
⑨ 代 理 人 弁理士 高橋政博 外1名

明 細 書

発明の名称

腎疾患の診断薬及び診断方法

特許請求の範囲

- (1) 濃縮ヒト正常尿から非透析性のグルコースを糖部分の主成分とする糖蛋白質ないし糖ペプチドを採取してなる、腎疾患の診断薬。
- (2) 濃縮ヒト正常尿から採取した非透析性のグルコースを糖部分の主成分とする糖蛋白質ないし糖ペプチドの、血中もしくは尿中における含量を測定することを特徴とする腎疾患の診断方法。

発明の詳細な説明

従来の医学常識では一般に Void Volume に入る物質は不純物として捨てられていたものであるが、本発明者が長年研究した結果、意外にも病的尿から採取した Void Volume に入る糖蛋白質ないし糖ペプチド^{糖/糖}が腎疾患の診断薬としてきわめて有効であることを発見した。

しかしながらこれを診断薬として工業的に実施するに当つては、原料が病的尿であるので実面的

でなかつた。

本発明者はさらに研究を続けた結果今回かかる診断薬を、大量に入手しうる原料である正常尿から簡単な手続きによつて、安価に提供しうる方法を発明した。

本発明の診断薬は次の如き手段によつてえられる。

先づ採取した尿を溶だて法の如き常法により濃縮する。次に、糖蛋白質ないし糖ペプチドに転換させるためにこの濃縮物を消化し分画する。

消化の手段としてはトリプシン、コラゲナーゼ、プロナーゼなどの酵素を用い、超濾心し上清を集める。

この際透析・傾結乾燥などの手段を加える方が一定条件のサンプルを得るための品質管理上好ましい。

次にこれを分画するが、その代表的手段としては次の2法がある。その何れによつてもよい。

(A) Zone 電気泳動法を行なう。第1図はその分画のパターンを示すものであつて、実線は280

00 吸収、破断はアンスロン法によるヘキソース量を示す。+、+ は活性部であつて糖ピークの部分のみに集中している。次にその有効部をトリクロール酢酸 (TCA) 処理したのち上清を集め、これにバイオゲル P300 などの分子篩の方法を加える。第3図はそのパターンを示すもので、第1図の活性部(糖部分)を集め、TCA を5%の割合に加えると沈殿が出るので、これを除去し、上清を脱塩後濃縮し、バイオゲル P300 のカラムにかけると2つのピークが現れ、活性は第1のピーク(主として Void Volume)のみに集中する。

(B) 高速液体クロマトグラフィー法により活性分画を採取し、これに TCA 処理を加え、上清を脱塩後凍結乾燥する。その一例として Waters 社製 ALC/GPC-200 を用い、カラムは μ Bondapak / C18、30% $\text{CH}_3\text{CN}/70\%$ K_2HPO_4 、pH 7.5 の系で流速 1 ml/min で展開したクロマトグラフィーを第3図に示す。retention time 3.5 分の位置のピークにのみ活性を認める。

第3図の第1ピークと第2ピークの糖部分をそ

(9)

またこの第1ピークのガスクロマトグラフィーパターンを第4図に示す。この図より、グルコース (a_1 及び a_2) が大部分を占め、ガラクトース (b_1 、 b_2 、 b_3) は痕跡程度であることがわかる。即ち以上において第1ピークと第2ピークとの差は、第2ピークで活性を示さずかつ、グルコースを含まないことであつて、この点は、Zone 電気泳動法、高速液体クロマトグラフィー法いずれの分画に際してもその活性部と不活性部との間に全く同様の関係が成立する。

本発明において「非透析性グルコースを主成分とする」理由を次に説明する。

本発明者はさき^{原から}に第1ピークからえられる糖蛋白ないし糖ペプチドと同一の性状を有する物質は糸球体基底膜からも得られることを発見した。糸球体基底膜からの糖ペプチドとしてはこの新しい糖ペプチド以外に既に2種類^{原から}のものが報告されているが、その内の1種類はグルコースを含まず、また他の1種類はグルコースを含んでいるが、このグルコースは透析性のものであつて、いずれも

(10)

それぞれガスクロマトグラフィーにて糖分析してみると、第1ピークは大部分がグルコースであり、ごく微量のガラクトースを含むが、後者は精製により除去される。一方、第2ピークはグルコースを含まない。そしてガラクトース、マンノース、N-アセチル-グルコサミンからなる。この組成を第1表に示す。

第1表 第1ピークと第2ピークの単糖組成

	グルコース	ガラクトース	マンノース	グルコサミン	ガラクトサミン
第1ピーク(活性部)	1	0.06	0	0.15	0
第2ピーク(不活性部)	0	1	0.0	1.19	0

* グルコースが0のため、ガラクトースを1として各単糖比率を出した。

単糖の含量はガスクロマトグラフィーによつて測定した。

(11)

生物活性を有していない。この点において本発明の糖ペプチドとは明確に区別される。

次に診断薬としての使用方法ならびに作用について説明する。

上に述べた第1ピークの物質を抗原としてウサギ免疫し抗血清を作製する。

A) これを I¹²⁵I でラベルした上で、二重抗体法によつて被検尿ないし血清について Radio-immuno assay を行なう。

B) 上述の如き方法で作製した抗血清と被検尿或は血清との間でオクタブロー法により測定する(キットを作製する)。

現在の段階では A) の方が鋭敏である。

C) 現在行なわれている尿糖測定法の内、テストテープで行なわれているものの大半は glucose-oxidase による β -グルコースの測定であるが、この方法では2糖、3糖、4糖、5糖のグルコースは陰性に終わっている。

3糖のグルコースを測定することによつて、しかもこれをテープに組み込み比色法によつて有効

(12)

糖蛋白ないし糖ペプチドの排出量を測定する。

本発明の診断薬を各種腎疾患の診断に適用した実施成績は第2表に示す通りである。

第2表 各種疾患における第1ピーク物質の排出量

診断対象	500	1000
正常ヒト尿	●●●●	
非腎疾患	●●●	
多発性骨髄腫	●●●	
糖尿病性腎症	●●	
慢性腎炎	●●●●	
ネフローゼ症候群(低蛋白血症)	●●●	
膜性腎炎	●●●●●●	
SLB(紅斑性狼瘡)の慢性腎炎タイプ	●●●●●	
SLB(紅斑性狼瘡)の膜性腎炎タイプ	●● ●●●●●	

●は症例数を示す。 500 1000

(7)

第2表において、種々の病的尿の中で膜性腎炎患者尿とSLB患者(殊にその糸球体基底膜変化の強い症例)の尿とにおいて殊に高値を示す。

一方、正常尿は著しく低値をとるのは当然であるが、こゝで注目されるのはネフローゼ症候群の中で低蛋白血症を示すタイプの症例の尿の場合であり、殆ど正常尿の場合と同じ程度の値を示している。この場合アルブミンの排出を主としており、アルブミンは糖を含まないので消化により収量は0となるからである。

周知のように、この低蛋白血症のネフローゼ症候群の場合も、上述の膜性腎炎の場合も、その何れも20~30g/dayという著しく大量の蛋白尿を排出する。そして両者間を区別するためには現在では腎生検の実施が不可欠である。

なぜなら両者の間でステロイドホルモン療法の効果と予后とが著しく異なるため、治療を開始する前に両者の鑑別をしておく必要があるからである。

従つて本法を適用すればネフローゼ症候群の鑑

(8)

別は生検なしに簡単に実施できることになる。

Lupus腎炎の糸球体^{基底膜}変化の強い例と然らざる例との両者とも強い蛋白尿を示すことが多いが、この間の鑑別も可能である。又糖尿病性腎症の鑑別も可能となる。

次に実施例を示す。

実施例

ヒト正常尿約300gから泡立て法などを利用して、濃縮し、透析・凍結乾燥して1gの粉末を得る。

かくして得られた尿粉末を少量の水に溶解し、0.1Mの硼酸ソーダでpH8.0に調節する。

トリブシンを尿粉末の0.5gの割合に加え、3時間37℃で消化する。その後60℃に30分間加熱してトリブシンを非活性化する。次で2000回転で35分間超遠心する。得られた上清を透析した上で凍結乾燥する。これを糖蛋白とする。一方、糖蛋白を少量の生理食塩水にとかし、0.1Mトリス酢酸バッファでpH7.4に調節し、コラゲナーゼを0.2gの割合に加え、24時間及び48時間経過

後にそれぞれ0.35g、0.1gの割合にコラゲナーゼを加え37℃で計72時間消化する。これを超遠心したのち得られた上清を透析・凍結乾燥する。このサンプルを少量の生理食塩水に溶かし、トリスバッファでpH7.4に調節し、プロナーゼを最初0.3gの割合に加え、更に0.1gの割合に24時間及び48時間目にそれぞれ加え計72時間37℃で消化する。超遠心したのち得られた上清を透析・凍結乾燥する。これを糖ペプチドとする。

糖蛋白ないし糖ペプチドサンプルをZone電気泳動で展開する。1.5×7.0×40.0cmのセルを用い、支持体としては0.05M硼酸バッファでpH7.2にしたGel 4275を用い、原点にはあらかじめ少量の同バッファで溶かしたサンプルを入れる。

これを4℃で150Vの条件で15時間前後泳動させる。

泳動後ブロックは2cm毎に切り出し、それぞれ5mlの蒸留水に入れる。そしてその上清を0.45μmガラスフィルターを通過させる。

そして、それぞれ250μl吸収とアンスロン法

(9)

(10)

によるヘキソース含量とを測定すると第1図にみるようなパターンが得られる。

それぞれの分画の活性の有無を抗糖蛋白(第1ピーク)血清を用いて調べると、高い糖ピークの部分にのみ活性が限局する。そこでこの部分のみを集め、5%の割合にTCAを加え、得られた沈澱を除去する。

上清を脱塩した後、これをバイオゲルP300のカラムにかけると、第2図に示す如く2つの糖ピークが得られるので、後の高い糖ピークは捨て、前のピークのみを集める。その収量は約20~30%で後のピークの1/10程度の1である。

これが診断基剤となる。

これでウサギを常法に従って免疫する。

但し糖蛋白ないし糖ペプチドで、しかも糖の部分に活性の主眼があるから、免疫の期間は通常の場合よりも長く2ヶ月以上が望ましい。

A) 得られた抗血清を I^{131} でラベルしてこれを用いてルチーンの方法により、二重抗体法にもとづくRadio-immuno assayを行なう。

B) オクトロニー法に基づく抗原抗体反応をおこなうために、抗血清を含んだキットを組む。

C) 活性糖ペプチドないし糖蛋白は3糖のグルコースからなる糖部分を有するので、この3糖グルコースを比色定量できるようにテスト・テープを作成する。

図面の簡単な説明

第1図は、Zone 電気泳動による分画のパターンを示す。

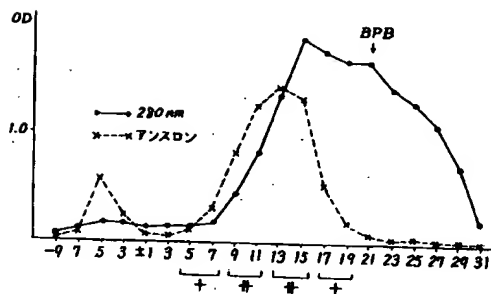
第2図は、第1図に有効部分のバイオゲルP300による分画のパターンを示す。

第3図は、高速液体クロマトグラフィーによる分画のパターンを示す。

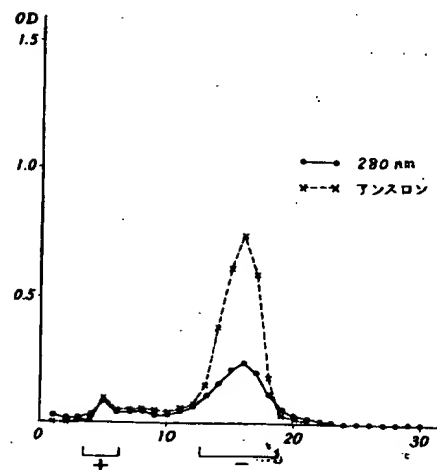
第4図は、第1ピークのガスクロマトグラフィーパターンを示す。

特許出願人 柴田 整一
代理人 高橋 政博
坂本 栄一

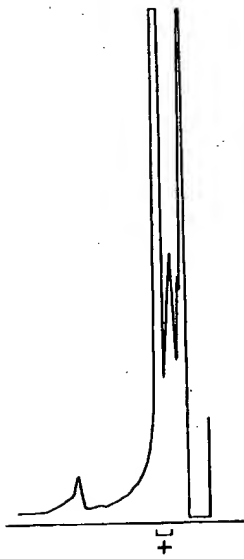
第1図



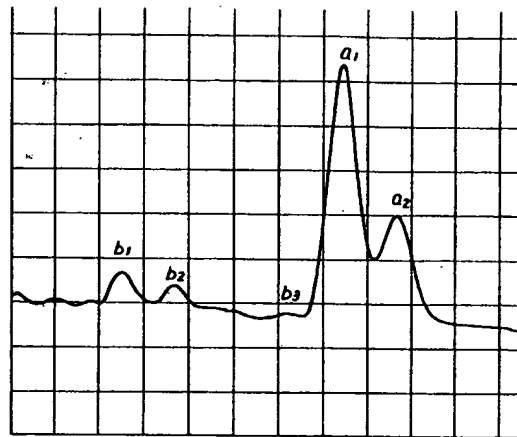
第2図



第 3 図



第 4 図



L37 ANSWER 493 OF 568 CA COPYRIGHT 2002 ACS
AN 93:91556 CA
TI Glycoproteins and sugar **peptides** for clinical analysis
IN Shibata, Seiichi
PA Japan
SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 5 pp.
PI JP 55037944 A2 19800317 JP 1978-111020 19780909
AB Nondialyzable, glucose-contg. glycoproteins or glycopeptides are isolated from normal **urine** for use in clin. anal. for the **diagnosis** of renal **disease**. Thus, **urine** (300 L) from normal subjects was concd., dialyzed, and freeze dried to give 1 g powd. product. The powder was dissolved in a small amt. of water, and the soln. was adjusted to pH 8.0 with 0.1M Na borate, treated with 0.5% trypsin at 37° for 3 h and then at 60° for 30 min. After centrifugation, the supernatant was dialyzed and freeze dried to produce glycoproteins, which were dissolved in a small amt. of saline, and the soln. was adjusted to pH 7.4 with 0.1M Tris-acetate buffer. The soln. was treated with collagenase and then Pronase, centrifuged, and the supernatant was freeze dried to give glycopeptides. The obtained glycoproteins or glycopeptides were subjected to zone electrophoresis, and the active fractions were eluted and treated with 5% TCA. After removal of the ppt., the supernatant was desalted and **chromatographed** on a Bio-Gel P 300 column to give products for use in clin. anal.

L2: Entry 1 of 1

File: JPAB

Mar 17, 1980

PUB-NO: JP355037944A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 55037944 A

TITLE: DIAGNOSIS CHEMICAL AND DIAGNOSIS METHOD OF KIDNEY DISEASE

PUBN-DATE: March 17, 1980

INVENTOR-INFORMATION:

NAME

COUNTRY

SHIBATA, SEIICHI

INT-CL (IPC): G01N 33/50

ABSTRACT:

PURPOSE: To obtain the diagnosis chemicals by using a particular glycoprotein and glycopeptido taken from the concentrated normal urine of the human being.

CONSTITUTION: The normal urine of the person is concentrated by a normal method (for example by foaming). The enzymes such as trypsin and collagenase are used and digested and thereafter subjected to electric migration to take the part (activated portion) of glycol peak. Then, about 5% of trichloroacetic acid is added thereto and the resultant deposit is filtered and removed to obtain the supernatant liquid. This liquid is subjected to the molecular mesh screen and the first peak thereof is taken to produce the glycoprotein and glycopeptido having the main composition of glycol portion of impermeable glycose and use it as a diagnosis chemicals for those of kidney disease. The above activating portion may be divided in accordance with the liquid chromatography method.